蛋氨酸对奶牛乳腺上皮细胞内乳脂合成相关基因和蛋白表达的影响

赵艳丽 陈 璐 史彬林 郭晓宇 闫素梅*

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘 要：本试验旨在研究蛋氨酸（Met）对奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）内乳脂合成相关基因和蛋白表达的影响，以探讨 Met 对乳脂合成的影响机理。将第 3 代 BMECs 随机分为 6 个处理（每个处理 6 个重复），培养液中 Met 浓度分别为 0.13、0.26、0.39、0.52、0.65 和 0.78 mmol/L。在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 48 h 后测定 BMECs 内甘油三酯（TG）的含量及乳脂合成相关基因和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）与固醇调节元件结合蛋白 1（SREBP1）蛋白的相对表达量。结果显示：Met 浓度对 BMECs 内 TG 含量无显著影响（$P>0.05$）。0.52~0.78 mmol/L Met 处理 BMECs 内脂肪酸结合蛋白 3（*FABP*3）、乙酰辅酶 A 羧化酶 A（*ACACA*）和 *PPARγ* 基因的相对表达量均显著高于其他处理（$P<0.05$）。BMECs 内脂蛋白脂酶（*LPL*）基因的相对表达量以 0.26~0.39 mmol/L Met 处理较高，显著高于 0.65~0.78 mmol/L Met 处理（$P<0.05$）。脂肪酸合成酶（*FASN*）基因的相对表达量以 0.39~0.52 mmol/L Met 处理在数值上较高，且 0.52 mmol/L Met 处理显著高于 0.13~0.26 mmol/L 和 0.65~0.78 mmol/L Met 处理（$P<0.05$）。Met 浓度可显著影响 *SREBP*1 和乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6（*AGPAT*6）基因及 SREBP1 和 PPARγ 蛋白的表达（$P<0.05$），均以 0.26 mmol/L Met 处理的相对表达量最高。结果表明，Met 浓度影响 BMECs 内脂肪酸摄取、从头合成的基因的表达及乳脂合成调控因子 *PPARγ* 和 *SREBP*1 的基因和蛋白的表达，Met 浓度为 0.26~0.52 mmol/L 时对 BMECs 内脂肪酸从头合成及长链脂肪酸摄取的促进效果较好。

收稿日期：2016-08-30

基金项目：国家奶业“973 计划”项目（2011CB1008003）

作者简介：赵艳丽（1986-），女，陕西榆林人，博士研究生，从事奶牛乳腺上皮细胞内乳脂乳蛋白合成调控研究。E-mail：ylzhao2010@163.com

*通讯信者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail：yansmimau@163.com

关键词：奶牛；乳腺上皮细胞；蛋氨酸；乳脂

中图分类号：　　　　　　　　　　　文献标识码：A　　　　　　　　　　　文章编号：

乳脂是牛奶的重要组成成分，也是衡量乳品质的重要指标。研究表明，氨基酸(AA)作为乳蛋白合成的重要前体物，不仅影响乳蛋白的合成，也是影响乳脂合成与组成的因素之一[1]。蛋氨酸（Met）作为奶牛的必需氨基酸，在对乳蛋白合成影响的同时，对乳腺内脂肪酸的从头合成也具有显著的影响[2]。因此，深入探讨 Met 对乳脂合成的影响及其机理对改善乳品质有重要意义。体内研究发现，皱胃灌注 40 g/d 的 Met 后，奶牛乳腺内中短链脂肪酸（medium and short chain fatty acids,SMCFA）（C4~C14）与长链脂肪酸（long-chain fatty acids,LCFA）的含量分别增加 11.1%和 9.8%[2]。体外研究发现，30 μg/mL 的 Met 上调奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells,BMECs）内脂肪酸从头合成基因乙酰辅酶 A 羧化酶 A(acetyl-coenzyme A carboxylase α,*ACACA*)的相对表达量[3]。可见，Met 影响奶牛乳脂的合成及组成，但以前的研究多偏重于 Met 对奶牛乳汁分泌和乳脂合成的影响效果，对于其机理探索涉及较少，有必要对此进行深入的试验研究。鉴于此，本试验以 BMECs 为模型，研究 Met 对乳脂合成相关基因和蛋白表达的影响，为进一步探讨 Met 对 BMECs 内乳脂合成的影响机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 基础培养基（12400-024）、胎牛血清（FBS，10099-141）、II 型胶原酶（17101-015）、胰岛素转铁蛋白硒钠（51500-056）、细胞培养用青链霉素混合液（15140-122）及 0.05%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸（EDTA）溶液（25300054）均购自 Gibco 公司。Met（M5308）、琼脂糖（A9539）、氢化可的松（H0135）、催乳素（L6520）、表皮生长因子（EGF，E4127）、油红 O 工作液（O9755），兔抗过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（peroxisome proliferator-activated receptor gamma,PPARγ）（AV32880）均购自 Sigma 公司。鼠抗固醇调节元件结合蛋白 1（sterol regulatory element binding protein 1,SREBP1）（ab3259）购自 Abcam 公司。RIPA 蛋白裂解液（P0013C）、

苯甲基磺酰氟（PMSF）（ST506）、二喹啉甲酸（BCA）蛋白浓度测定试剂盒（P0012）、Western 一抗稀释液（P0023A）、Western 二抗稀释液（P0023D）、Western 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳液（P0014B）、Western 转膜液（P0012B）、ECL 化学超敏显色液（P0018）均购自北京碧云天公司。RNAiso Plus（D9109B）、PrimeScript™ RT Master Mix（DRR036A）和 SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ（DRR820A）均购自 TaKaRa 公司。Tris-HCl 缓冲液（TBST）、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（10494-1-AP）、辣根过氧化物酶（HRP）标记山羊抗兔二抗（04-15-06）、HRP 标记山羊抗鼠二抗（LK2003）分别购自 HyClone、Proteintech、KPL、三箭公司。无蛋白封闭液（C520041）购自上海生工有限公司。

1.2 试剂配制

Met 工作液的配制：试验开始前，称取 0.159 7 g 的 Met 粉末溶于 20 mL DMEM/F12 基础培养基中，配制成浓度为 52 mmol/L 的 Met 溶液，0.22 μm 滤器过滤。以 52 mmol/L 的 Met 溶液为贮备液配制成不同 Met 浓度的细胞培养液，使得 BMECs 反应体系培养液中 Met 终浓度分别为 0.13、0.26、0.39、0.52、0.65 和 0.78 mmol/L。

生长培养基的配制：在 100 mL 的 DMEM/F12 基础培养基中添加所需试剂，最终使其含 10% 胎牛血清、1%胰岛素转铁蛋白硒钠、1 μg/mL 氢化可的松、0.5%胰岛素转铁蛋白硒钠、10 ng/mL 表皮生长因子、5 μg/mL 催乳素、100 μg/mL 链霉素、100 IU/mL 青霉素和 2.5 μg/mL 两性霉素 B。

1.3 BMECs 的培养

采用胶原酶消化法培养 BMECs，具体参照 Sheng 等[4]的方法进行。从内蒙古呼和浩特市北亚清真屠宰场选取健康泌乳的荷斯坦奶牛乳腺组织低温运回实验室。从深层取约 1 cm^3 组织块放入 3×双抗的磷酸盐缓冲液（PBS）中。随后分别用 3×双抗的 PBS 清洗 3 遍、75%酒精清洗 30 s、1×PBS 清洗 3 遍。剪取腺泡丰富的部位放入 5 mL 无菌无酶的离心管中。再将其剪成糊状后加入等体积 0.5%的Ⅱ型胶原酶，37 ℃消化 1 h，每 20 min 上下颠倒混匀 1 次，使其充分消化。80 目滤网过滤后，1 300 r/min 离心 5 min，PBS 冲洗细胞 1 次，1 300 r/min 离心 3 min，PBS 重复冲洗 2 次。用

生长培养基悬浮接种于 25 cm^2 透气培养瓶中，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，直至原代细胞贴壁率达约 90%后用 0.05%胰蛋白酶-EDTA 溶液纯化和传代细胞。

1.4 试验设计

收集第 3 代 BMECs 并悬浮于生长培养基中按照试验要求的密度接种于细胞培养板上，于 37 ℃、5% CO_2 培养 24 h。试验采用单因子随机试验设计，将 BMECs 培养 24 h 后随机分为 6 个处理，每个处理 6 个重复。根据课题组前期的试验结果[5]选取不同浓度的 Met，分别为 0.13、0.26、0.39、0.52、0.65 和 0.78 mmol/L，Met 的最低浓度为 Rius 等[6]和王新朋[7]报道中奶牛动脉血中 Met 浓度的 5 倍。BMECs 贴壁率为 80%~90%时，用无血清 DMEM/F12 培养基饥饿培养 12 h 后每孔加入含不同浓度 Met 的细胞培养液。37 ℃、5% CO_2 培养 48 h，研究 Met 对 BMECs 内乳脂合成影响的机理。

1.5 测试指标与方法

1.5.1 BMECs 内甘油三酯（TG）含量的测定

BMECs 内 TG 含量的测定按照 Ramiírez-Zacaríias 等[8]的方法进行，以吸光度（OD）值的大小表示其含量。将细胞悬液以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔培养板，按上述试验设计培养 48 h 后，弃培养液，PBS 漂洗 2 次，每孔加入 4%多聚甲醛溶液 0.2 mL 固定细胞 1 h 后，PBS 漂洗 2 次，0.5 mL 油红 O 工作液避光浸染 2 h。然后用 PBS 漂洗 3 次，晾干培养板后，加入 0.3 mL 异丙醇萃取 30 min，用全自动酶标仪在波长为 510 nm 处测定其 OD 值。每个处理 6 个重复。

1.5.2 BMECs 内乳脂合成相关基因表达的测定

采用荧光定量 PCR（Thermo，美国）检测 BMECs 内乳脂合成相关基因脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，*FASN*）、*ACACA*、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶（stearoyl-CoA desaturase，*SCD*）、脂肪酸结合蛋白 3（fatty acid-binding protein 3，*FABP*3）、脂蛋白脂酶（lipoprotein lipase，*LPL*）、*PPARγ*、*SREBP*1、乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6（1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6，*AGPAT*6）、线粒体甘油-3-磷酸酰基转移酶（mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase，

GPAM）、磷脂酸磷酸酯酶 1（phosphatidic acid phosphatase 1，*LPIN*1）、嗜乳脂蛋白亚家族 1 成员 1（butyrophilin subfamily 1 member A1，*BTN*1*A*1）、黄嘌呤脱氢酶（xanthine dehydrogenase，*XDH*）的表达，使用 Primer 5.0 进行引物设计（表 1）。将细胞悬液以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔培养板，按上述试验设计培养 48 h 后提取总 RNA。BMECs 内总 RNA 的提取采用 Trizol 法，于全自动酶标仪上检测总 RNA 的纯度与浓度，OD 值 A260/A280 在 1.8~2.2 范围内表示 RNA 纯度较好。2%凝胶上电泳检测 RNA 完整性。RNA 反转录成 cDNA 的具体操作步骤按照 PrimeScript™ RT Master Mix 的说明书进行，反转录体系为 10 μL。基因表达量的检测依据 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行操作，反应体系为 20 uL。以 *GAPDH* 为管家基因。实时荧光定量 PCR 的反应程序为：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s；60 ℃退火 34 s，95 ℃延伸 20 s，进行 40 个循环；95 ℃、5 s，60 ℃、30 s，95 ℃、15 s，51 个循环；绘制熔解曲线。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行目的基因相对表达量的计算。

表 1 乳脂合成相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes related with milk fat synthesis

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank No.	引物序列 Primer sequences (5’-3’)	长度 Length/bp	参考文献 References
GAPDH	XM_001252479	F：GGGTCATCATCTCTGCACCT	177	Zhou 等[9]
		R：GGTCATAAGTCCCTCCACGA		
FASN	NM_001012669	F：AGGACCTCGTGAAGGCTGTGA	85	Qi 等[10]
		R：CCAAGGTCTGAAAGCGAGCTG		
ACACA	AJ132890	F：CATCTTGTCCGAAACGTCGAT	101	Bionaz 等[11]
		R：CCCTTCGAACATACACCTCCA		
SCD	AY241933	F：TCCTGTTGTTGTGCTTCATCC	101	Bionaz 等[11]
		R：GGCATAACGGAATAAGGTGGC		
*FABP*3	DN518905	F：GAACTCGACTCCCAGCTTGAA	102	Bionaz 等[11]
		R：AAGCCTACCACAATCATCGAAG		
LPL	BC118091	F：*ACACA*GCTGAGGACACTTGCC	101	Bionaz 等[11]
		R：GCCATGGATCACCACAAAGG		
PPARγ	NM_181024	F：CCAAATATCGGTGGGAGTCG	101	Bionaz 等[11]
		R：ACAGCGAAGGGCTCACTCTC		
*SREBP*1	NM_001113302	F：CTGACGACCGTGAAAACAGA	334	张养东[12]

		R：AGACGGCAGATTTATTCAACTT		
*AGPAT*6	DY208485	F：AAGCAAGTTGCCCATCCTCA R：AAACTGTGGCTCCAATTTCGA	101	Bionaz 等[11]
GPAM	NM_001012282.1	F：GCAGGTTTATCCAGTATGGCATT R： GGACTGATATCTTCCTGATCATCTTG	63	Bionaz 等[11]
*LPIN*1	DV797268	F：TGGCCACCAGAATAAAGCATG R：GCTGACGCTGGACAACAGG	101	自行设计
*BTN*1*A*1	M35551	F：AGGACGGACTGGGCAATTG R：GAACCCATTCTCGGGAGTCAT	81	Bionaz 等[11]
XDH	BC102076	F：GATCATCCACTTTTCTGCCAATG R：CCTCGTCTTGGTGCTTCCAA	100	自行设计

GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶 glycerol phosphate dehydrogenase；*FASN*：脂肪酸合成酶 fatty acid synthase；*ACACA*：乙酸辅酶 A 羧化酶 A acetyl-coenzyme A carboxylase α；*SCD*：硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 stearoyl-CoA desaturase；*FABP*3：脂肪酸结合蛋白 3 fatty acid-binding protein 3；*LPL*：脂蛋白脂酶 lipoprotein lipase；*PPARγ*：过氧化物酶体增殖物激活受体 γ peroxisome proliferator-activated receptor gamma；*SREBP*1：与固醇调节元件结合蛋白 1 sterol regulatory element binding protein 1；*AGPAT*6：乙酰甘油磷酸脂酰转移酶 6 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6；*GPAM*：线粒体甘油-3-磷酸酰基转移酶 mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase；*LPIN*1：磷脂酸磷酸酯酶 1 phosphatidic acid phosphatase 1；*BTN*1*A*1：嗜乳脂蛋白亚家族 1 成员 1 butyrophilin subfamily 1 member A1；*XDH*：黄嘌呤脱氢酶 xanthine dehydrogenase。表 2 同。The same as below.

1.5.3 BMECs 内乳脂合成相关蛋白表达的测定

将细胞悬液以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶，按上述试验设计培养 48 h 后，弃上清，PBS 清洗贴壁生长的细胞 2 次，加入 0.1% PMSF 的 RIPA 细胞裂解液 250 μL，4 ℃裂解 5 min 后收集细胞悬液，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液检测乳脂合成相关蛋白 PPARγ 和 SREBP1 蛋白的表达。将 60 μg 待检测蛋白样品与 5×上样缓冲液按照 4:1 的比例混合，100 ℃条件下变性 5 min 后进行电泳，于浓缩胶上 80 V 电泳 40 min，分离胶 120 V 电泳 100 min。目的蛋白经电泳分离后转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。转膜完成后，用蒸馏水冲洗 1 min，室温封闭 1 h 后，TBST 洗涤 3 次，每次 2 min。然后分别用兔抗 PPARγ（1:250）和鼠抗 SREBP1（1:50）于 4 ℃

孵育过夜，取出 PVDF 膜后 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。用山羊抗兔二抗（1:1 000）和山羊抗鼠二抗（1:500）室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 8 min。利用 ECL 化学超敏显色液进行显色，凝胶成像仪上照相、分析（Tanongis-1000，上海天能生物科技公司）。图片用 Quantity one 软件进行灰度值分析。PPARγ 和 SREBP1 蛋白的相对表达量采用各处理与 Met 浓度为 0.13 mmol/L 的处理的比值表示。

16 数据处理

所有数据通过 Excel 2007 进行计算和整理，采用 SAS 9.0 分析软件的方差分析（ANOVA）程序进行显著性检验。$P<0.05$ 表示差异显著，$0.05<P<0.10$ 表示差异趋于显著。

2 结 果

2.1 Met 对 BMECs 内 TG 含量和乳脂合成相关基因表达的影响

如表 2 所示，不同浓度的 Met 对 BMECs 内 TG 含量无显著影响（$P>0.05$），从数值上看，以 0.39~0.65 mmol/L 组 TG 含量较高。0.39~0.78 mmol/L Met 处理 BMECs 内 *FABP*3 基因的相对表达量显著高于 0.13~0.26 mmol/L Met 处理（$P<0.05$），且 0.52 和 0.78 mmol/L Met 处理显著高于 0.39 mmol/L Met 处理（$P<0.05$）。0.52 mmol/L Met 处理 BMECs 内 *FASN* 基因的相对表达量显著高于 0.13~0.26 mmol/L 和 0.65~0.78 mmol/L Met 处理（$P<0.05$）。BMECs 内 *LPL* 基因的相对表达量以 0.26~0.39 mmol/L Met 处理较高，显著高于 0.65~0.78 mmol/L Met 处理（$P<0.05$）。0.52~0.78 mmol/L Met 处理 BMECs 内 *ACACA* 和 *PPARγ* 基因的相对表达量显著高于其他处理（$P<0.05$）。随着 Met 浓度的增加，BMECs 内 *SREBP*1 和 *AGPAT*6 基因的相对表达量均先增加后降低，但各处理均高于 0.13 mmol/L Met 处理，同时 0.26 mmol/L Met 处理的 *SREBP*1 基因的相对表达量显著高于其他处理（$P<0.05$），0.26 mmol/L Met 处理的 *AGPAT*6 基因的相对表达量显著高于 0.13 mmol/L 和 0.39~0.52 mmol/L Met 处理（$P<0.05$）。不同 Met 浓度处理间 BMECs 内 *SCD*、*GPAM*、*LPIN*1、*XDH* 和 *BTN*1*A*1 基因的相对表达量均无显著差异（$P>0.05$）。

表 2 Met 对 BMECs 内 TG 含量和乳脂合成相关基因表达的影响

Table 2 Effects of Met on TG content and expression of genes related with milk fat synthesis in BMECs

项目 Items	Met 浓度 Met concentration/(mmol/L) 0.13	0.26	0.39	0.52	0.65	0.78	SEM	*P* 值 *P*-value
甘油三酯含量 TG content	0.097	0.099	0.108	0.114	0.109	0.100	0.003	0.313
乳脂合成相关基因的相对表达量 Relative expression levels of genes related with milk fat synthesis								
*FABP*3	1.00^{c}	1.02^{c}	1.26^{b}	1.66^{a}	1.44^{ab}	1.51^{a}	0.109	<0.001
LPL	1.00^{bc}	1.28^{a}	1.12^{ab}	0.92^{bc}	0.80^{c}	0.80^{c}	0.097	0.005
FASN	1.00^{b}	1.03^{b}	1.14^{ab}	1.29^{a}	0.95^{b}	0.89^{b}	0.113	0.018
ACACA	1.00^{c}	1.12^{c}	0.97^{c}	2.49^{b}	2.99^{a}	2.84^{a}	0.175	<0.001
SCD	1.00	0.91	0.89	1.00	1.00	1.02	0.058	0.120
PPARγ	1.00^{d}	1.20^{cd}	1.33^{c}	1.68^{a}	1.57^{a}	1.82^{a}	0.142	<0.001
*SREBP*1	1.00^{c}	2.04^{a}	1.50^{bc}	1.35^{bc}	1.26^{bc}	1.53^{b}	0.232	<0.001
*AGPAT*6	1.00^{b}	1.79^{a}	1.10^{b}	1.28^{b}	1.43^{ab}	1.36^{ab}	0.206	0.019
GPAM	1.00	1.20	1.27	1.16	1.07	1.03	0.117	0.198
*LPIN*1	1.00	1.22	1.12	1.08	0.89	0.89	0.165	0.309
XDH	1.00	1.04	1.04	1.07	1.06	1.01	0.124	0.991
*BTN*1A1	1.00	1.03	1.02	1.08	1.13	0.99	0.093	0.656

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著（$P>0.05$），不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。下表同。

Values in the same row with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2 Met 对 BMECs 内乳脂合成相关蛋白表达的影响

如表 3 和图 1 所示，0.26~0.78mmol/L Met 处理 BMECs 内 PPARγ 和 SREBP1 蛋白的相对表达量显著高于 0.13 mmol/L Met 处理（$P<0.05$），尤以 0.26 mmol/L Met 处理最高，显著高于其他处理组（$P<0.05$）。0.39~0.78 mmol/L Met 处理间 BMECs 内 PPARγ 蛋白的相对表达量无显著差异（$P>0.05$）；0.39 mmol/L Met 处理 BMECs 内 SREBP1 蛋白的相对表达量显著高于 0.52~0.78 mmol/L Met 处理（$P<0.05$），0.78 mmol/L Met 处理 SREBP1 蛋白的相对表达量最低，显著低于其他各处理（$P<0.05$）。

表 3 Met 对 BMECs 内乳脂合成相关蛋白表达的影响

Table 3 Effects of Met on expression of proteins related with milk fat synthesis in BMECs

项目 Items	Met 浓度 Met concentration/(mmol/L) 0.13	0.26	0.39	0.52	0.65	0.78	SEM	*P* 值 *P*-value
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ PPARγ	1.00[c]	2.82[a]	2.36[b]	2.32[b]	2.36[b]	2.35[b]	0.042	<0.001
与固醇调节元件结合蛋白 1 SREBP1	1.00[e]	2.16[a]	2.02[b]	1.54[c]	1.52[c]	1.36[d]	0.038	<0.001

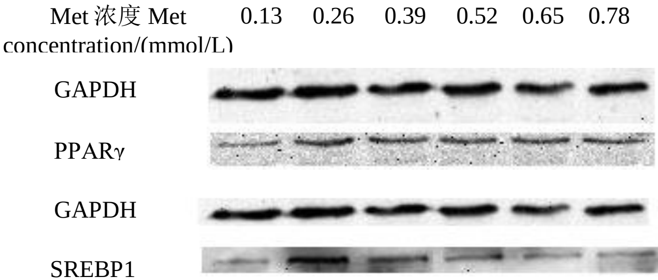


图 1 Met 对 BMECs 内乳脂合成相关蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of Met on expression of proteins related with milk fat synthesis in BMECs

3 讨 论

Met 作为奶牛的必需氨基酸，体内研究发现其在对乳蛋白合成产生影响的同时，可引起奶牛乳腺内 SMCFA（C4~C16）的从头合成与 LCFA 含量的增加[2]；体外的研究资料报道，30 μg/mL 的 Met 上调 BMECs 内脂肪酸从头合成基因 *ACACA* 的表达[3]。这些研究提示 Met 对乳脂的合成有一定的影响，但其影响机理尚不清楚。本研究在前人研究的基础上并结合本课题组前期的结果[5]设计了不同的 Met 浓度梯度，从乳脂合成相关基因和蛋白表达的角度探讨 Met 对乳脂合成的影响。由于培养液中与体内相似浓度的必需氨基酸对奶牛乳腺内的代谢的影响非常小，只有培养液中必需氨基酸浓度为正常血浆浓度的数倍以上才会产生较显著的影响[13]，印象本研究中 Met 的最低浓度为 Rius 等[6]和王新朋[7]报道中奶牛动脉血中 Met 浓度的 5 倍以上。*LPL* 和 *FABP*3 是参与哺乳动物多种组织中 LCFA 摄取与细胞内转运的重要基因[14]。LPL 决定脂肪细胞的大小和脂肪的累积程度，可将血液中的乳糜微粒和极低密度脂蛋白携带的 TG 催化水解释放出甘油和脂肪酸[15]，供组织储存和

利用。FABP3 主要与细胞内 LCFA 的转运有关。本研究结果得出适宜浓度的 Met 对 BMECs 内的 *FABP*3 和 *LPL* 基因的相对表达量有显著的促进作用，说明 Met 对 BMECs 内 LCFA 的摄取及转运有一定促进效果。

SREBP1 属于核转录因子家族，是脂肪合成基因的重要转录调控因子，可以调节脂肪酸合成相关基因的表达。FASN 和 ACACA 是参与奶牛乳脂肪酸从头合成过程的 2 个关键酶，其中 ACACA 是脂肪酸从头合成的一种限速酶，催化乙酰-辅酶 A 羧化生成丙二酸单酰辅酶 A。在泌乳期间乳腺内 *FASN* 编码的蛋白 FASN 调控 SMCFA（C4~C16）的合成[16]。*SREBP*1 正向调控 *FABP*3、*ACACA* 和 *FASN* 基因的表达，进而调节脂肪酸的转运和从头合成。*SREBP*1 基因的功能或表达受 PPARγ 的调控[11]。同时，PPARγ 可以正向调控奶山羊乳腺上皮细胞内 *ACACA*、*FASN*、*FABP*3、*AGPAT*6、*SREBP*1 基因[17]及脂肪细胞中 *LPL* 基因的表达[18]。研究发现生长培养基中添加 Met 可上调 BMECs 内 *ACACA* 基因的表达[3]；饲喂青贮饲料的奶牛皱胃灌注 Met 后，乳中 SMCFA（C4~C14）的从头合成随着 Met 灌注量的增加而增加，灌注量为 40 g/d 时 C4~C14 含量增加 11.1%，但 C16 含量变化不显著[2]。本试验结果表明，适宜浓度的 Met 可促进 *SREBP*1 和 *PPARγ* 的基因和蛋白的表达，上调 *FASN* 和 *ACACA* 基因的表达，即 Met 可能通过上调 *SREBP*1 和 *PPARγ* 基因和蛋白表达，进而上调 *FASN* 和 *ACACA* 基因的表达，从而促进 SMCFA 的合成。

TG 在乳脂中的含量为 98%，其含量高低直接反映乳脂肪的合成。本试验结果得出，适宜浓度的 Met 促进 SMCFA 的从头合成及 BMECs 内 LCFA 的摄取与转运，但对 TG 合成的影响不显著，其机制尚不清楚。有研究发现奶牛乳腺组织内 SCFA 进入 TG 合成途径受二酰基甘油酰基转移酶 1（*DGAT*1）基因调控，*DGAT*1 与 TG 合成相关的其他基因相比，对乳脂合成的影响较小，但对 TG 合成仍非常重要[11]。C>10 的脂肪酸被长链酰基辅酶 A 合成酶家族成员 1（ACSL1）激活后与 FABP3 结合，然后进入 TG 合成[11]，*ACSL*1 的过表达可促进 LCFA 进入 TG 合成[19]。本研究发现 Met 可上调 *PPARγ* 和 *FABP*3 基因的表达，但对 TG 合成的影响不显著。BMECs 内激活 PPARγ 可上调 *DGAT*1 基因的表达，但不影响 *ACSL*1 基因的表达[20]，这说明 Met 对 TG 合成的影响可能与

*ACSL*1 有关，但相关研究报道较少，有待于进一步研究探讨。*GPAM*、*AGPAT*6 和 *LPIN*1 是参与TG 合成的主要基因，同时其编码的蛋白也是参与乳脂合成的关键酶[19]。GPAM 催化脂酰辅酶 A 结合到甘油-3-磷酸 sn-1 位点合成溶血磷脂酸，AGPAT6 催化第 2 个脂酰辅酶 A 结合到甘油-3-磷酸 sn-2 位点形成磷脂酸（PA）。LPIN1 能转移磷酸基团，将 PA 转变成二酰甘油，之后，第 3 个脂酰辅酶 A 酯化到甘油的 sn-3 位点合成 TG。XDH 在乳脂肪球和细胞顶膜偶联过程中起重要作用，BTN1A1 在乳腺细胞分泌时帮助形成乳脂滴。本试验结果得出，Met 对 BMECs 内 *GPAM*、*LPIN*1、*BTN*1*A*1 和 *XDH* 基因的表达以及 TG 含量均无显著影响，但适宜浓度的 Met 可显著促进 *AGPAT*6 基因的表达。一项泌乳小鼠的研究发现，敲除 *AGPAT*6 基因后不能合成乳脂，但在富含 *AGPAT*6 基因的细胞膜内，以 sn-1-酰基甘油和乙酰辅酶 A 为底物的研究中，未检测到 GPAM 和 AGPAT6 活性的增加[21]。也有研究发现 AGPAT6 是一种微粒体甘油-3-磷酸脂酰转移酶（GPAT），也被称为 GPAT4[22]，且过表达小鼠 *GPAT*4 基因不影响 TG 的含量[23]，这说明 TG 的合成不仅在转录水平受到 *GPAM* 和 *AGPAT*6 基因表达的影响，可能还受到其编码的蛋白的表达量及活性的影响。由此推测本试验结果得出的 Met 显著促进 *AGPAT*6 基因的表达但对 TG 的合成无显著影响的结果可能与 *GPAM* 和 *AGPAT*6 编码的蛋白的表达量及活性有关，需要进一步探讨。

综合 TG 合成、乳脂合成相关基因及 SREBP1 和 PPARγ 蛋白的表达结果可以看出，Met 的浓度影响脂肪酸摄取及从头合成。0.26~0.78 mmol/L Met 处理 BMECs 内 SREBP1 和 PPARγ 蛋白的相对表达量均较高。随着 Met 浓度的增加，BMECs 内 *FABP*3 和 *ACACA* 基因的相对表达量增加，尤以 0.52~0.78 mmol/LMet 处理的相对表达量较高，但高浓度 Met（0.65~0.78 mmol/L）抑制 *LPL* 和 *FASN* 基因的表达。综合乳脂合成的多项指标，Met 浓度以 0.26~0.52 mmol/L 为宜。另外，本研究也通过回归分析得出，*ACACA* 和 *PPARγ* 基因的表达随 Met 浓度的增加而增加，Met 浓度分别达到 0.73、0.42、0.55、0.53、0.46 和 0.44 mmol/L 时，*FABP*3、*FASN* 和 *AGPAT*6 基因的表达、PPARγ 蛋白的表达、*SREBP*1 基因和蛋白的表达均达到最佳，但由于 0.73 mmol/L 的 Met 抑制 *LPL* 基因的表达，综合这些结果得出，Met 最佳浓度为 0.42~0.55 mmol/L。在实际生产中，NRC(2001)推荐泌

乳奶牛 Met 的供给量应占到饲粮代谢蛋白质的 2.4%，且有关 Met 对奶牛乳脂的研究多侧重于对乳脂率和乳脂量方面的影响，而针对影响机理的研究涉及很少，因此，本研究利用体外法得出的结果还需要在体内进一步验证。

4 结 论

Met 浓度影响 BMECs 内脂肪酸摄取、从头合成的基因表达及乳脂合成调控因子 *PPARγ* 和 *SREBP*1 基因和蛋白的表达，Met 浓度为 0.26~0.52 mmol/L 时，对 BMECs 内脂肪酸从头合成及长链脂肪酸摄取的促进效果较好。

参考文献：

[1] MAXIN G,RULQUIN H,GLASSER F.Response of milk fat concentration and yield to nutrient supply in dairy cows[J].Animal:An International Journal of Animal Bioscience,2011,5(8):1299–1310.

[2] VARIKKO T,VANHATALO A,JALAVA T,et al.Lactation and metabolic responses to graded abomasal doses of methionine and lysine in cows fed grass silage diets[J].Journal of Dairy Science,1999,82(12):2659–2673.

[3] 李喜艳.奶牛乳腺上皮细胞中赖氨酸蛋氨酸配比模式对酪蛋白合成的影响及机理研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2011.

[4] SHENG R,YAN S M,QI L Z,et al.Effect of the ratios of acetate and β-hydroxybutyrate on the expression of milk fat-and protein-related genes in bovine mammary epithelial cells[J].Czech Journal of Animal Science,2015,60(12):531–541.

[5] 常晨城.蛋氨酸及含蛋氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白合成相关基因表达的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[6] RIUS A G,APPUHAMY J A D R N,CYRIAC J,et al.Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids[J].Journal of Dairy Science,2010,93(7):3114–3127.

[7] 王新朋.阴外动脉灌注氨基酸和脂肪酸对奶牛乳腺蛋白质合成和氨基酸摄取规律的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[8] RAMIÍREZ-ZACARÍAS J,CASTRO-MUÑOZLEDO F,KURI-HARCUCH W,et al.Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O[J].Histochemistry,1992,97(6):493–497.

[9] ZHOU Y,AKERS R M,JIANG H.Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T Cells[J].Journal of Dairy Science,2008,91(1):100–108.

[10] QI L Z,YAN S M,SHENG R,et al.Effects of saturated long-chain fatty acid on mRNA expression of genes associated with milk fat and protein biosynthesis in bovine mammary epithelial cells[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2014,27(3):414–421.

[11] BIONAZ M,LOOR J J.Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J].BMC Genomics,2008,9:366.

[12] 张养东.脂多糖对泌乳奶牛乳脂肪和乳蛋白影响及其机理研究[D].博士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2011.

[13] HANIGAN M D,CROMPTON L A,METCALF J A,et al.Modelling mammary metabolism in the dairy cow to predict milk constituent yield,with emphasis on amino acid metabolism and milk protein production:model construction[J].Journal of Theoretical Biology,2001,213(2):223–239.

[14] LRHNER R,KUKSIS A.Biosynthesis of triacylglycerols[J].Progress in Lipid Research,1996,35(2):169–201.

[15] BONNET M,LEROUX C,CHILLIARD Y,et al.Rapid communication:nucleotide sequence of the ovine lipoprotein lipase cDNA[J].Journal of Animal Science,2000,78(11):2994–2995.

[16] WAKIL S J.Fatty acid synthase,a proficient multifunctional enzyme[J].Biochemistry,1989,28(11):4523–4530.

[17] SHI H,LUO J,ZHU J,et al.PPARγ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats[J].PPAR Research,2013,2013:310948.

[18] DESVERGNE B,MICHALIK L,WAHLI W.Transcriptional regulation of metabolism[J].Physiological Reviews,2006,86(2):465–514.

[19] BIONAZ M,LOOR J J.*ACSL*1,*AGPAT*6,*FABP*3,*LPIN*1,and *SLC*27*A*6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation[J].The Journal of Nutrition,2008,138(6):1019–1024.

[20] KADEGOWDA A K G,BIONAZ M,PIPEROVA L S,et al.Peroxisome proliferator-activated receptor-γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents[J].Journal of Dairy Science,2009,92(9):4276–4289.

[21] BEIGNEUX A P,VERGNES L,QIAO X,et al.*Agpat6*—a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium[J].The Journal of Lipid Research,2006,47(4):734–744.

[22] CHEN Y Q,KUO M S,LI S,et al.AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase[J].The Journal of Biological Chemistry,2008,283(15):10048–10057.

[23] NAGLE C A,VERGNES L,DEJONG H,et al.Identification of a novel *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform,GPAT4,as the enzyme deficient in *Agpat6*$^{-/-}$ mice[J].The Journal of Lipid Research,2008,49(4):823–831.

Effects of Methionine on Expression of Genes and Proteins Related with Milk Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

ZHAO Yanli CHEN Lu SHI Binlin GUO Xiaoyu YAN Sumei*

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com (责任编辑 菅景颖)

(*Collage of Animal Science, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China*)

Abstract: This study was to study the effects of methionine (Met) on expression of genes and proteins related with milk fat synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs), in order to investigate the mechenism of Met regulating milk fat synthesis. The third generation of BMECs were divided into six group with six replicates and cultured in culture mediums with 0.13, 0.26, 0.39, 0.52, 0.65 and 0.78 mmol/L Met, respectively. The triglyceride （TG） content, the relative expression levels of genes related with milk fat synthesis, as well as the protein relative expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (*PPARγ*) and sterol regulatory element binding protein 1 (*SREBP*1) in BMECs after 48 h incubation at 37 ℃ and 5% CO_2 were detected. The results showed that the optimal Met concentration had no significant effect on TG content in BMECs (P>0.05). The gene relative expression levels of fatty acid-binding protein 3 (*FABP*3), acetyl-CoA carboxylase A (*ACACA*) and *PPARγ* in BMECs of 0.52 to 0.78 mmol/L Met treatments were significantly higher than those of other treatments (P<0.05). The gene relative expression level of lipoprotein lipase (*LPL*) in BMECs of 0.26 to 0.39 mmol/L Met treatments was higher, which significantly higher than that of 0.65 to 0.78 mmol/L treatments (P<0.05). The gene relative expression level of fatty acid synthase (*FASN*) in BMECs of 0.39 to 0.52 mmol/L Met treatments was higher in media, and it of 0.52 mmol/L Met treatment was significantly higher than that of 0.13 to 0.26 mmol/L and 0.65 to 0.78 mmol/L Met treatments (P<0.05). Met concentration could significantly affect the gene expression of *SREBP*1 and 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 （*AGPAT*6） and the protein expression of SREBP1 and PPARγin BMECs (P<0.05), and the highest relative expression levels of them were all observed in 0.26 mmol/L Met treatment. These results demonstrate that Met concentration affects the expression of genes related with long-chain fatty acids uptake and *de novo* synthesis of fatty acids, as well as the gene and protein expression of *SREBP*1 and *PPARγ* which were milk fat synthesis regulatory factors in BMECs. Met with the concentrations of 0.26 to 0.52 mmol/L can produce the better effects for long-chain fatty acids uptake and de *novo synthesis* of fatty acids in BMECs.

Key words: dairy cow; bovine mammary epithelial cells; methionine; milk fat